

Osnova

2.Přednáška

Kvasinka jako modelová buňka/organismus

Srovnání *S.cerevisiae* a *S. pombe*

Výhody

Nomenklatura, auxotrofie

Vektory

Genetické manipulace

Techniky

Fenotyp

S.cerevisiae stabilní haploidní i diploidní buňky

Osnova

3.Přednáška

Kvasinka jako modelová buňka/organismus

Srovnání *S.cerevisiae* a *S. pombe*

Výhody

Nomenklatura, auxotrfie

Vektory

Genetické manipulace

Příprava mutant

Analýza mutant

Buněčný cyklus

Párování haploidních buněk

Regulace transkripce

Přepínání párovacího typu

Příprava mutant

- Studium funkce genu – fenotyp delece či mutace
 - Nezbytný gen = smrt – plasmid nebo mutanty
 - Přežívají – křížení tj. hledání funkčně příbuzných genů
 - Studium funkčních homologií – dvojité mutanty (synthetic lethal x epistatic)

-V případě esenciálních genů je diploid transformován plasmidem s exprimovatelným wt genem – po jeho vypnutí se sleduje „terminální fenotyp“

-Pro sledování terminálního fenotypu jsou však lepší „kondicionální mutanty“ tj. teplotně (nebo chladově) sensitivní mutanty

-Mutagenese (většinou náhodná) a následná selekce markeru či fenotypu (např. mutace v metabolických drahách, sekreci, morfologii atd.)

Cloning the Wild-type Gene by Complementation

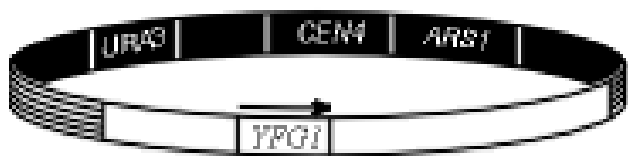
Transform a *MAT α yfg1 ura3-52* strain with a YCp50 library.

Isolate Ura⁺ transformants and score for Yfg⁺



Recover the YCp-*YFG1*⁺ plasmid in *E. coli*

Analyze the plasmid by digestion with restriction endonucleases and DNA sequencing



Ověření pravosti (mutant+delece)

Mutant Isolation

Mutagenesis of a haploid *MAT α* strain



Detection of Yfg⁻



Complementation

Cross the Yfg⁻ *MAT α* mutant to *MAT α* tester strains. Isolate diploid strains. Score for Yfg⁺ and Yfg⁻

MAT α yfg1 X

- MAT α YFG⁺* ○
- MAT α yfg1* ●
- MAT α yfg2* ○
- MAT α yfg3* ○
- etc. ○

Křížení – ověření - jedna mutace

- rozdělení do komplementačních skupin (allelická kompl.)

Meiotic Analysis

Cross mutant to *MAT α YFG⁺*



Isolate a diploid strain and Sporulate



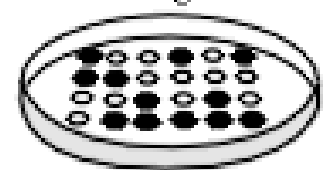
Digest ascus walls



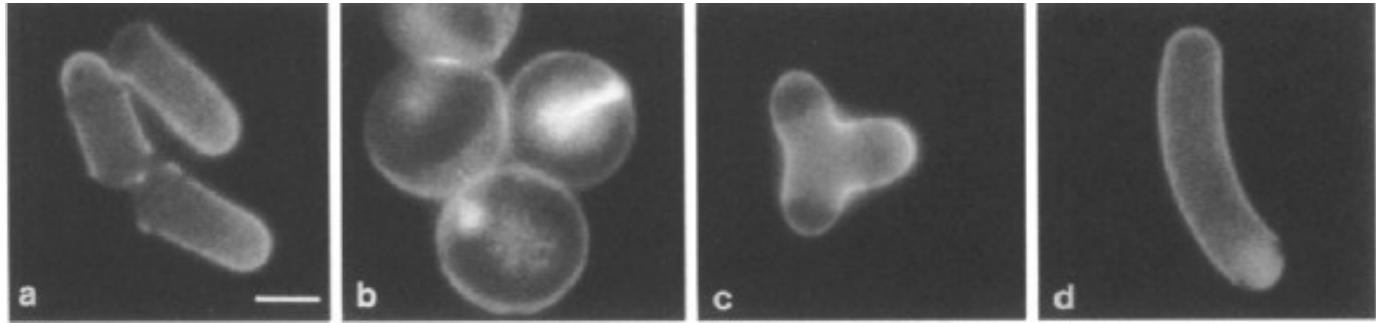
Dissect 4 spores of each tetrad



Score for Yfg⁺ and Yfg⁻



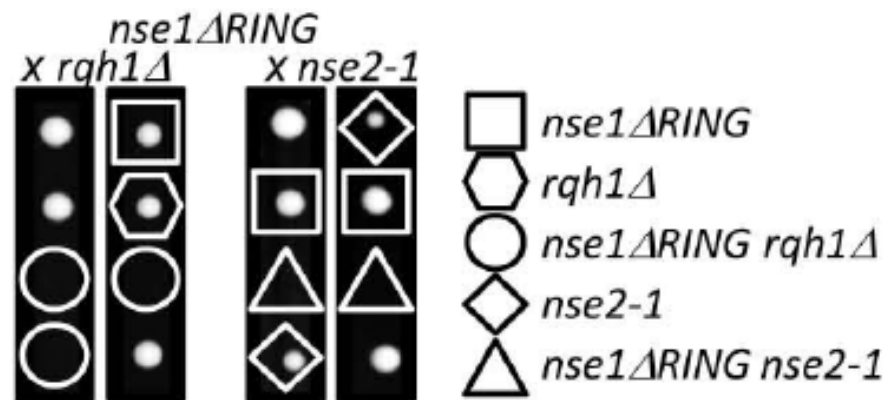
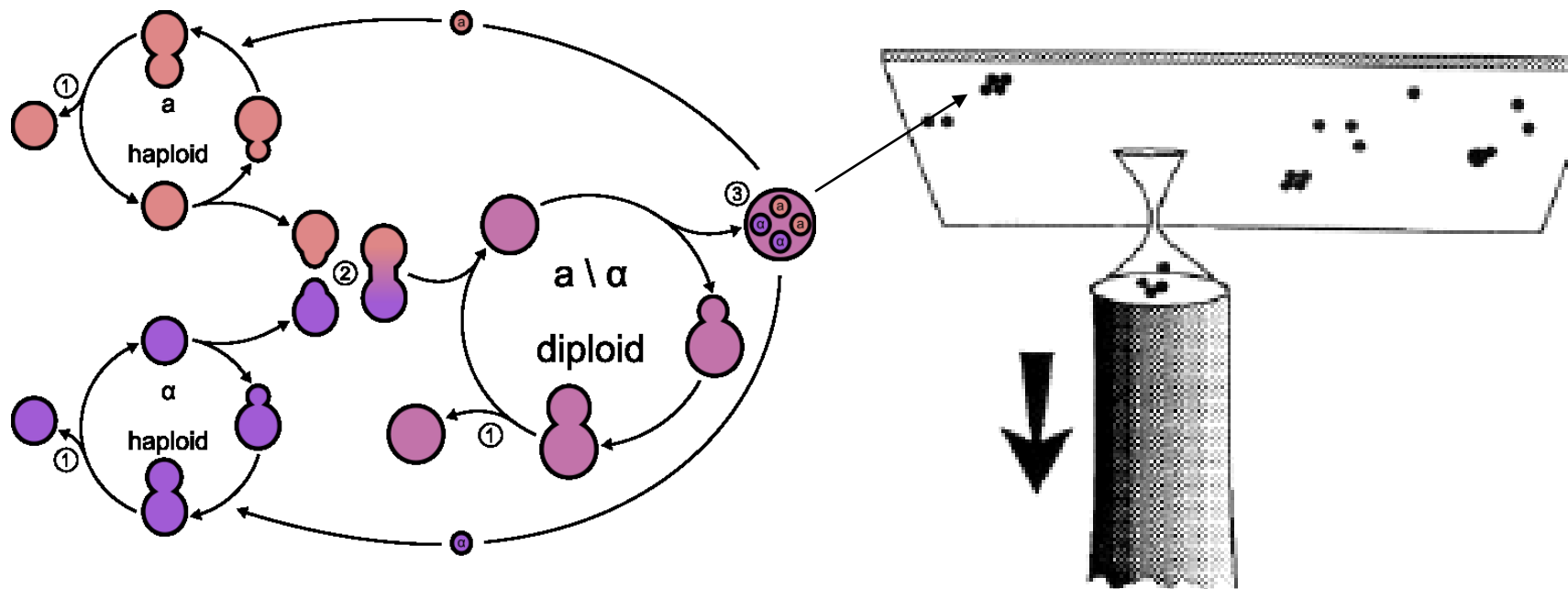
- mutagenese *S. pombe* – hledání ts mutant (55 000 kolonii) s defektní morfologií – našli 64 kmenů (3 druhy defektu: 51 kulatých=*orb*, 8 tip elongation aberrant=*tea*, 5 banana=*ban*)



- z 51 *orb* mutant křížených s WT segregovalo 43 v poměru 2:2 tj. jeden gen (8 sterilních), „linkage analysis“ mezi mutantami ukázala 12 *orb* genů (skupin – Tab. I) ... vztahy mezi nimi (synthetic lethality) a známými geny (multicopy suppressor)

Table I. *orb* Genes

Gene	Alleles	Synthetic lethality	Close linkage ⁺	Multicopy suppression
<i>orb1</i>	6 (3 [±])	<i>orb2, orb6</i>		
<i>orb2</i>	2 (4 [±])	<i>orb1, orb6</i>		
<i>orb3</i>	1 (1 [±])			
<i>orb4</i>	12 (1 [±])		<i>sts5</i> [±]	<i>pck1⁺, pyp1⁺</i>
<i>orb5</i>	2 (2 [±])			
<i>orb6</i>	4	<i>orb1, orb2</i>		
<i>orb7</i>	1		<i>cwg2</i> ^l	
<i>orb8</i>	6	<i>orb9, orb11</i>		
<i>orb9</i>	1	<i>orb8, orb11</i>		
<i>orb10</i>	4			
<i>orb11</i>	2	<i>orb8, orb9</i>	<i>cwg1</i> ^l	
<i>orb12</i>	2			<i>pck1⁺, pyp1⁺, ras1⁺</i>

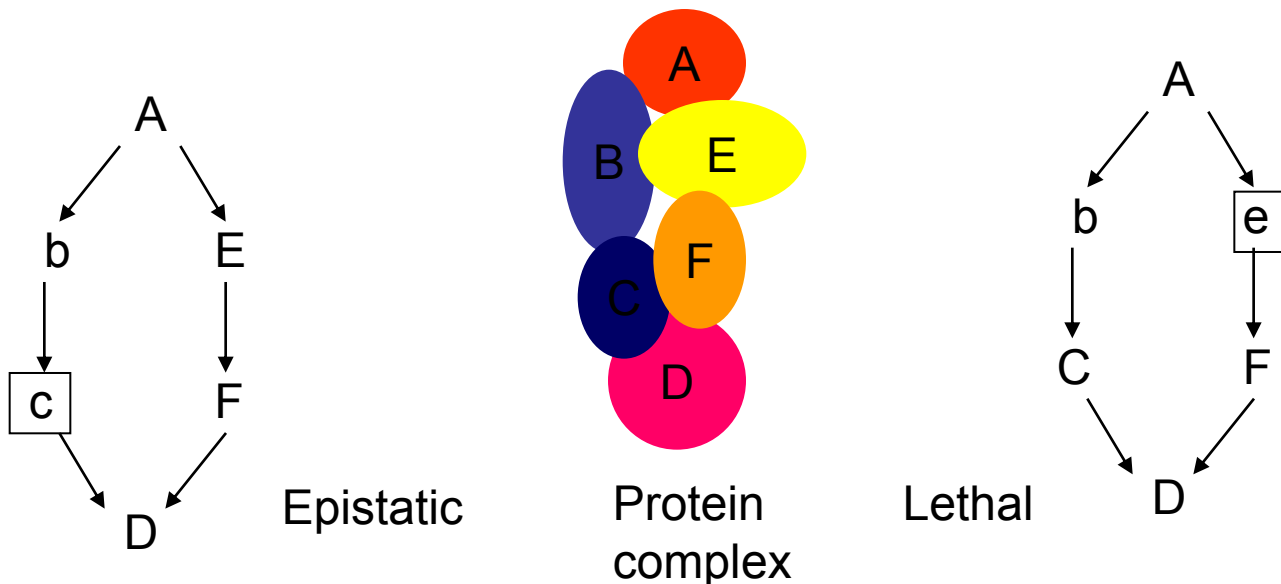


Dvojité mutanty – funkční příbuznost

Mutagenese pomocí hydroxylaminu ...

stejný fenotyp - diploid - identický gen (nebo dominantní)
- haploid – epistatický (funkčně příbuzné)

Aditivní až letální – haploid – paralelní dráha, redundance, rozpad komplexu

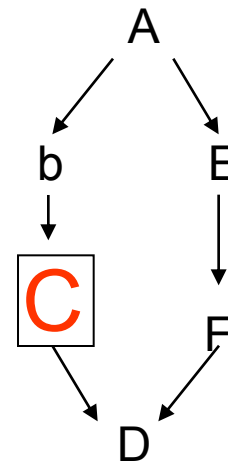
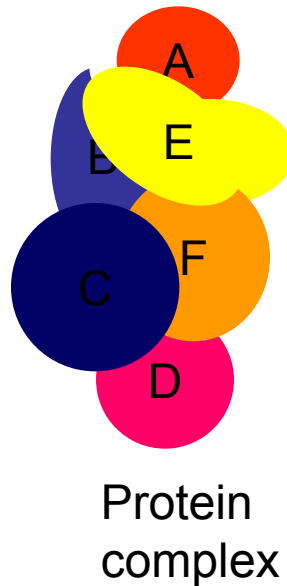
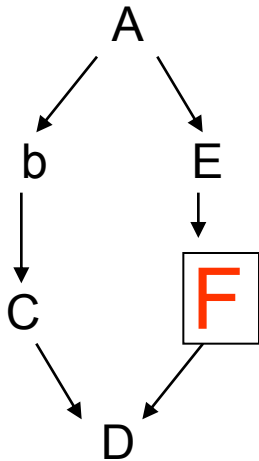


Hledání (screening) letálního mutanta – mutagenese kmene s vypínatelným plasmidem (promotor nebo FOA)

Supresory

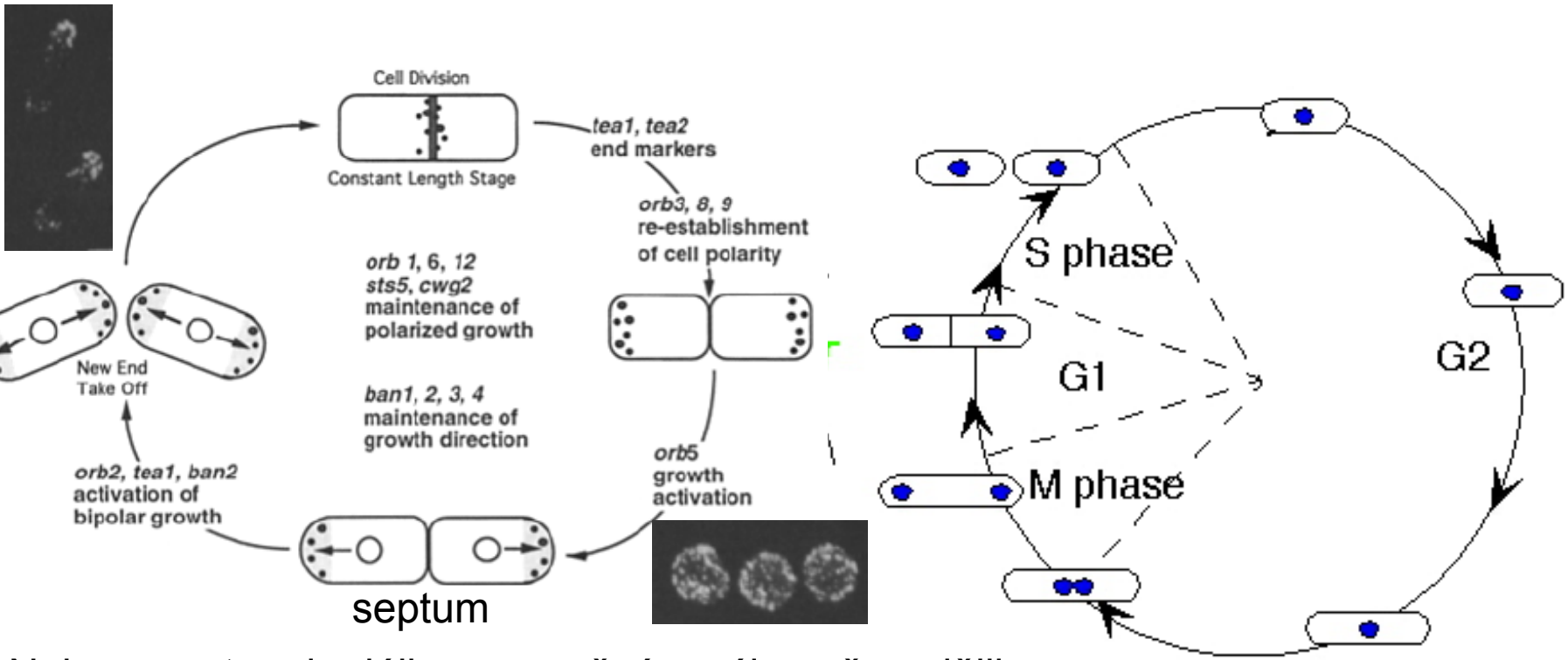
Supresory potlačují původní fenotyp:

- nadprodukce proteinu z paralelní dráhy
- nadprodukce proteinu z téže dráhy
- mutace téhož genu „napraví“ původní
- mutace sousedního (protein) zesílí oslabenou interakci



Buněčný cyklus *S. pombe*

S. pombe má rovnocenné dělení - vznikají buňky stejné velikosti – hned vstupují do S fáze (jsou dostatečně velké) – pro vstup do mitózy musí být dvojnásobná velikost (kontrola v G2 fázi => nejdelší je G2 fáze)



Nejprve rostou do délky na opačném pólu než se dělily

Vegetative (mitotic) cycle

Nobelova cena za výzkum buněčného cyklu v roce 2001

Leland Hartwell začala studovat buněčný cyklus v 60. letech na *S. cerevisiae*. Podařilo se jí izolovat kvasinky, které měly mutovaný gen kontrolující buněčný cyklus. V následujících letech identifikovala podobným způsobem více než 100 genů kontrolujících buněčný cyklus. Také sledovala citlivost kvasinek na poškození DNA radiací. Zjistila, že BC je při poškození DNA zastaven – aby získal čas na opravu DNA

Paul Nurse studoval buněčný cyklus na *S. pombe*. V 70. letech objevil gen *cdc2*, který je zodpovědný za regulaci většiny fází BC. V roce 1987 izoloval homologní lidský gen a nazval jej CDK1 (cyclin dependent kinase).

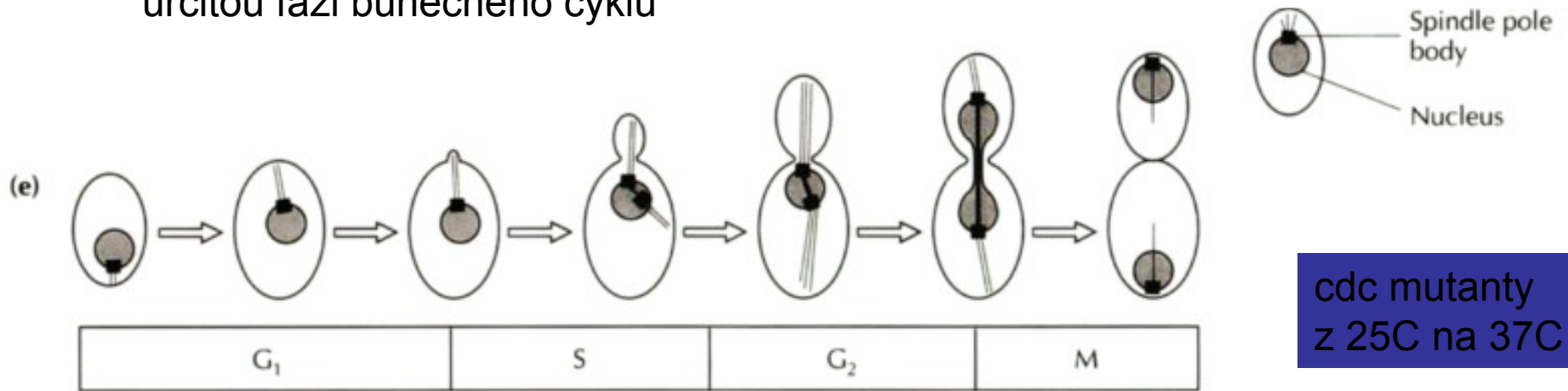
V květnu 2008 měl přednášku v Brně, v rámci Mendlových seminářů



Tim Hunt na začátku 80. let objevil první cyklin – cykliny jsou proteiny, které jsou syntetizovány a odbourávány během určité části buněčného cyklu. Cykliny se váží na CDK a regulují jejich aktivitu.

Buněčný cyklus *S. cerevisiae*

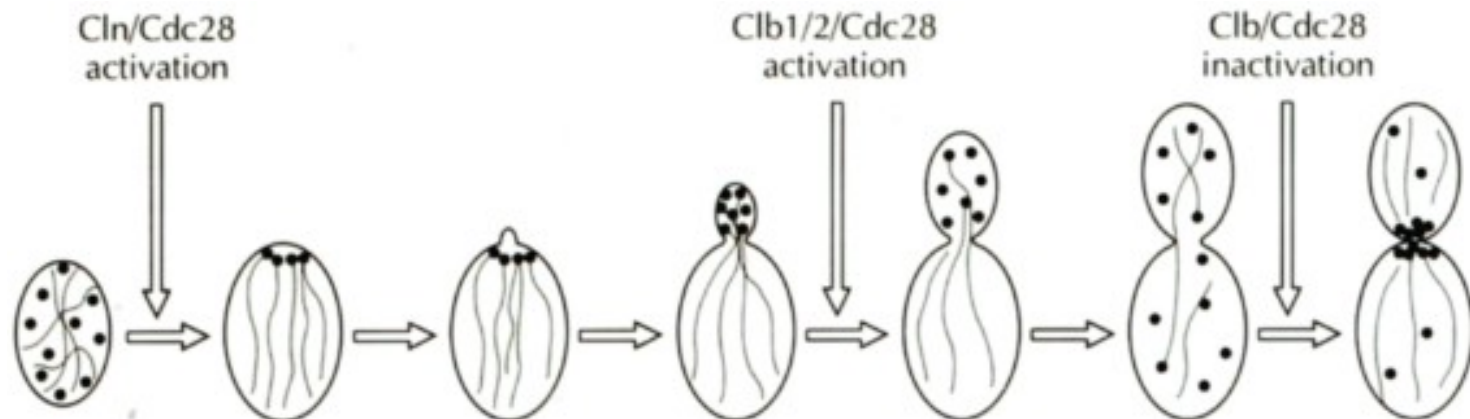
- Generovali teplotně-citlivé mutanty, z kterých vybírali kmeny zastavující v určité fázi buněčného cyklu (*cdc* = „cell division cycle“ mutanty)
- Výběr dle morfologických (diagnostických) znaků charakteristických pro určitou fázi buněčného cyklu



- zahájení tvorby pupene a duplikace SPB – začátek S fáze
- rozchod jaderných plaků na opačné póly – přechod z S do G₂ fáze
- jádro se protahuje – začátek M fáze (mitózy)
- oddělení pupene – cytokineze – přechod z M do G₁
- Oddělená dceřinná buňka je menší než mateřská – nerovnocenné dělení – pro další dělení musí dosáhnout určité velikosti => dlouhá G₁ fáze (*S.pombe* má rovnocenné dělení – velikost se kontroluje v G₂ fázi => nejdelší je G₂ fáze)

Klíčovým mezníkem BC u *S. cerevisiae* je START, kdy se rozhoduje o přechodu z G1 do S fáze

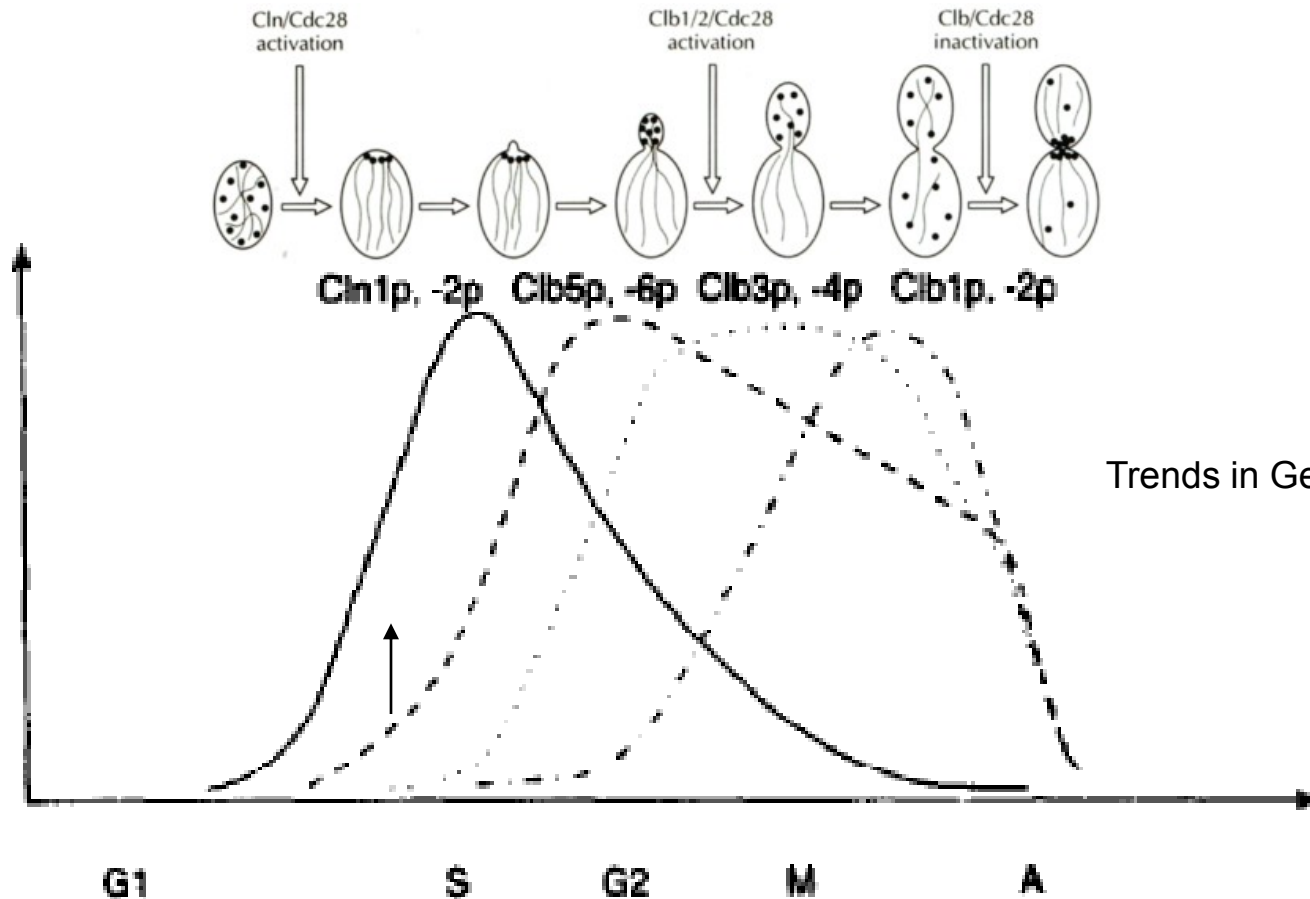
- pro další dělení musí buňka v G1 fázi dosáhnout určité velikosti
 - haploidní buňky v přítomnosti partnera zastavují v G1 fázi a konjugují
 - diploidní buňky (při nedostatku N a C) zastavují v G1 a zahajují sporulaci
 - při vyčerpání živin z média přechází z G1 do stacionární fáze
 - nedostatek dusíku – růst pseudohyf
-
- STARTovní interval lze rozdělit na úsek A a B
 - v úseku A se rozhoduje o přechodu do stacionární fáze (mutanty zastavené v této fázi nemohou konjugovat)
 - v úseku B se rozhoduje o konjugaci či sporulaci (arest pomocí alfa-faktoru, nemůže být zvolena alternativa přechodu do stacionární fáze)
-
- v úseku A hrají roli *CDC25* a *CDC35* (komponenty RAS dráhy)
 - pro úsek B (a další „checkpoints“) je klíčový *CDC28* (tj. CDK1) a příslušné cykliny



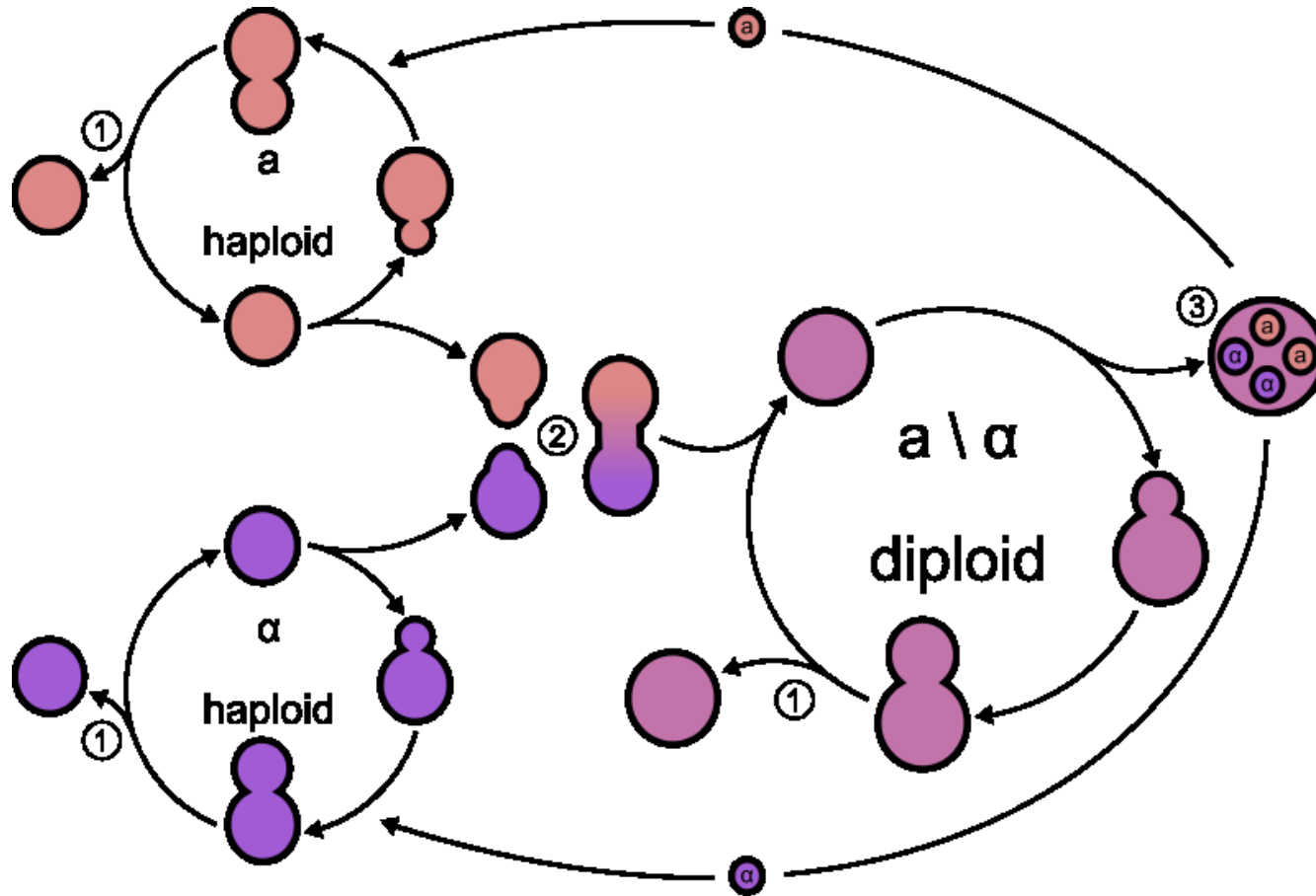
CDC28 a cykliny u *S. cerevisiae*

Interakce fosforylované Cdc28p s cyklinem (defosforylace) vzniká aktivní komplex:

- v G1 fázi *CLN1* a *CLN2* (*CLN3* mRNA je konstantní)
- pro vstup do S fáze jsou nutné *CLB5* a *CLB6* (transkripce stimulovaná *CLN*)
- zahájení mitózy se účastní *CLB3* a *CLB4*
- mitózu ukončují *CLB1* a *CLB2*



Párování *S. cerevisiae*



Párování (mating) – konjugace – zastavení v G1 fázi – feromony opačného MAT typu

α-feromon se používá k synchronizaci buněk v G1 (elutriace pro buňky v G0, HU pro S fázi, nocodazol pro G2)

Průběh konjugace

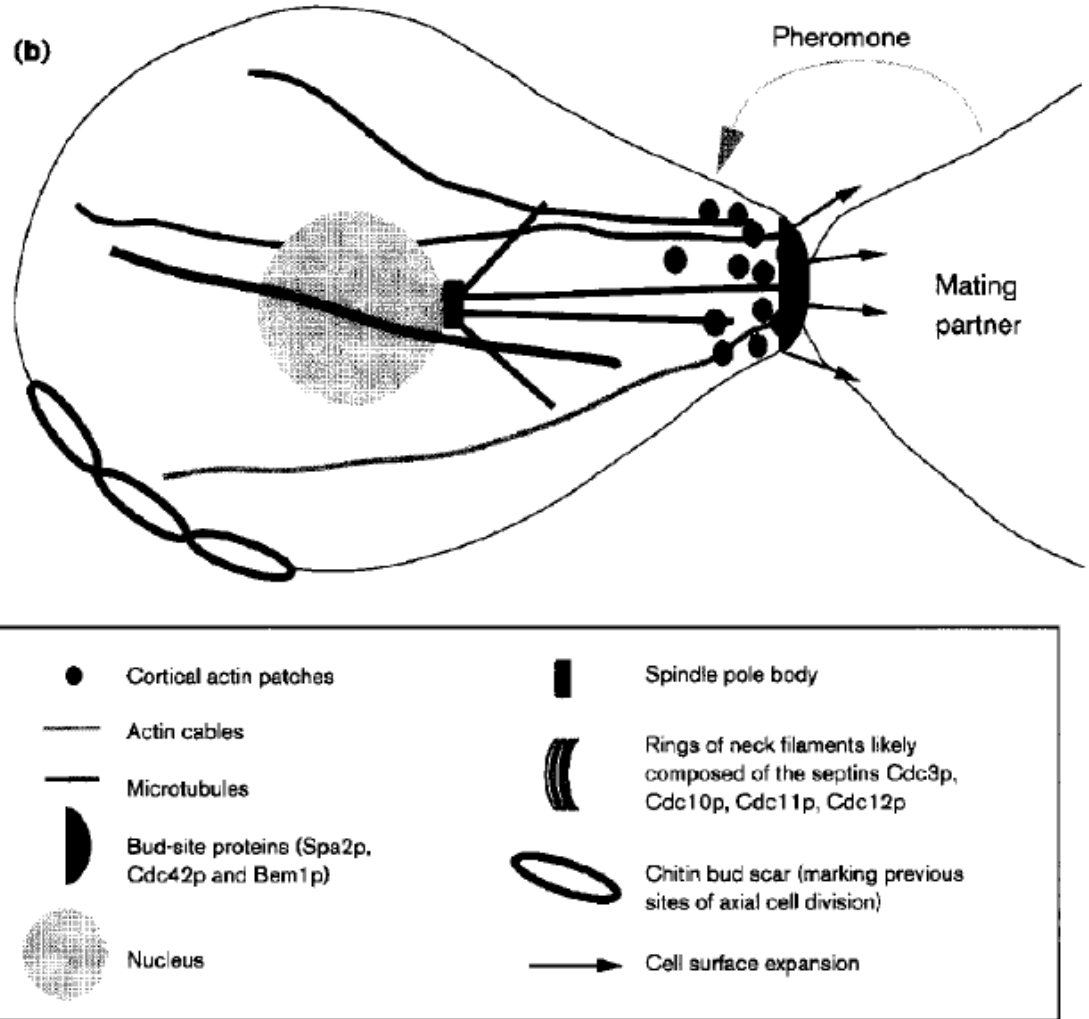
Změna tvaru ... aglutinace ... spojení ...

Feromony se váží na receptory

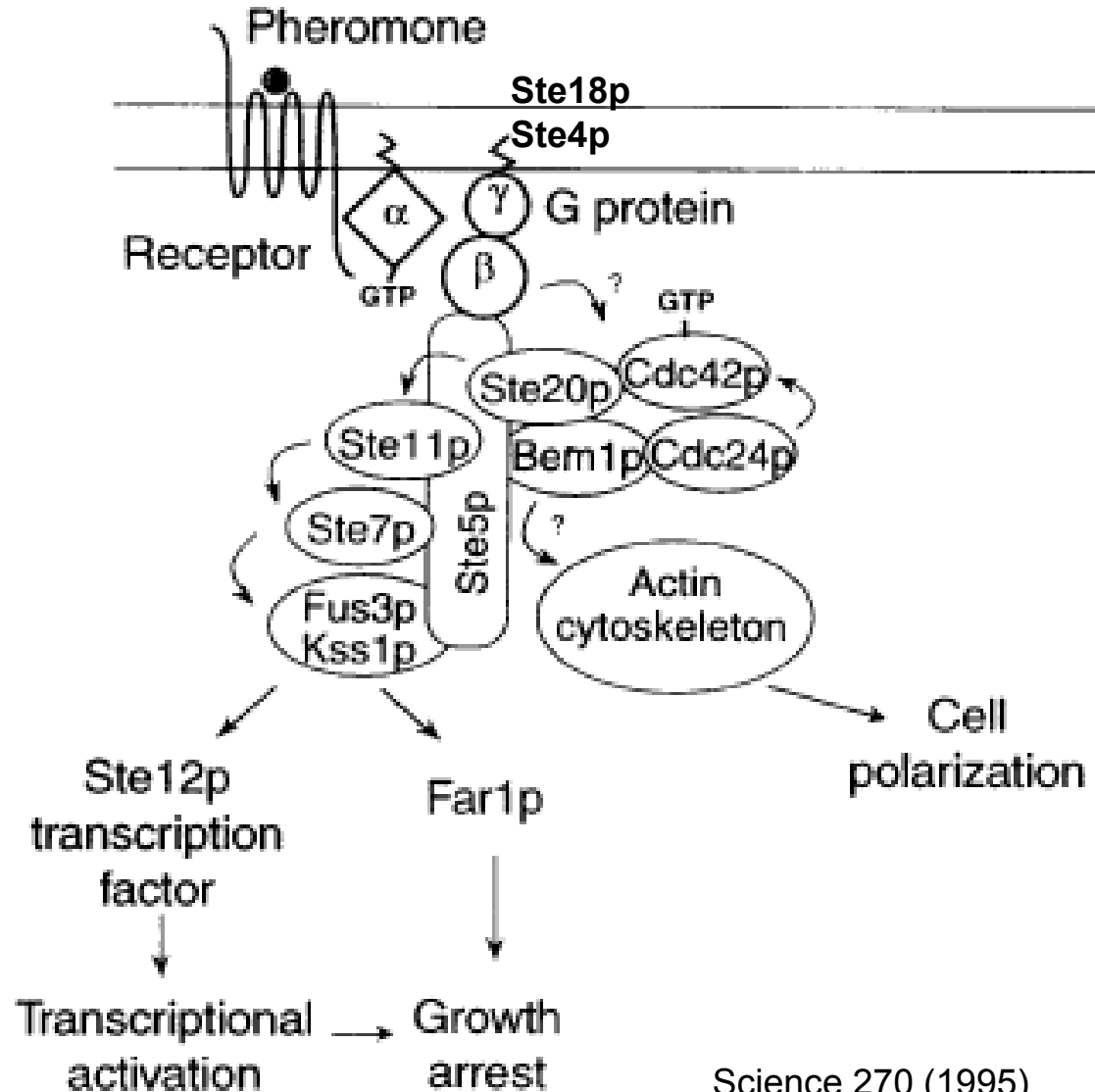
další receptory lokalizovány
specificky do stejného místa

zastaví v G1 fázi a změní tvar
(„shmoo“ směrem k partnerovi)
tj. změna cytoskeletu a buněčné
stěny

vytváří zygotu a splývají jádra



Signální feromonová dráha



ste mutanty - sterile

Chromosom III obsahuje:

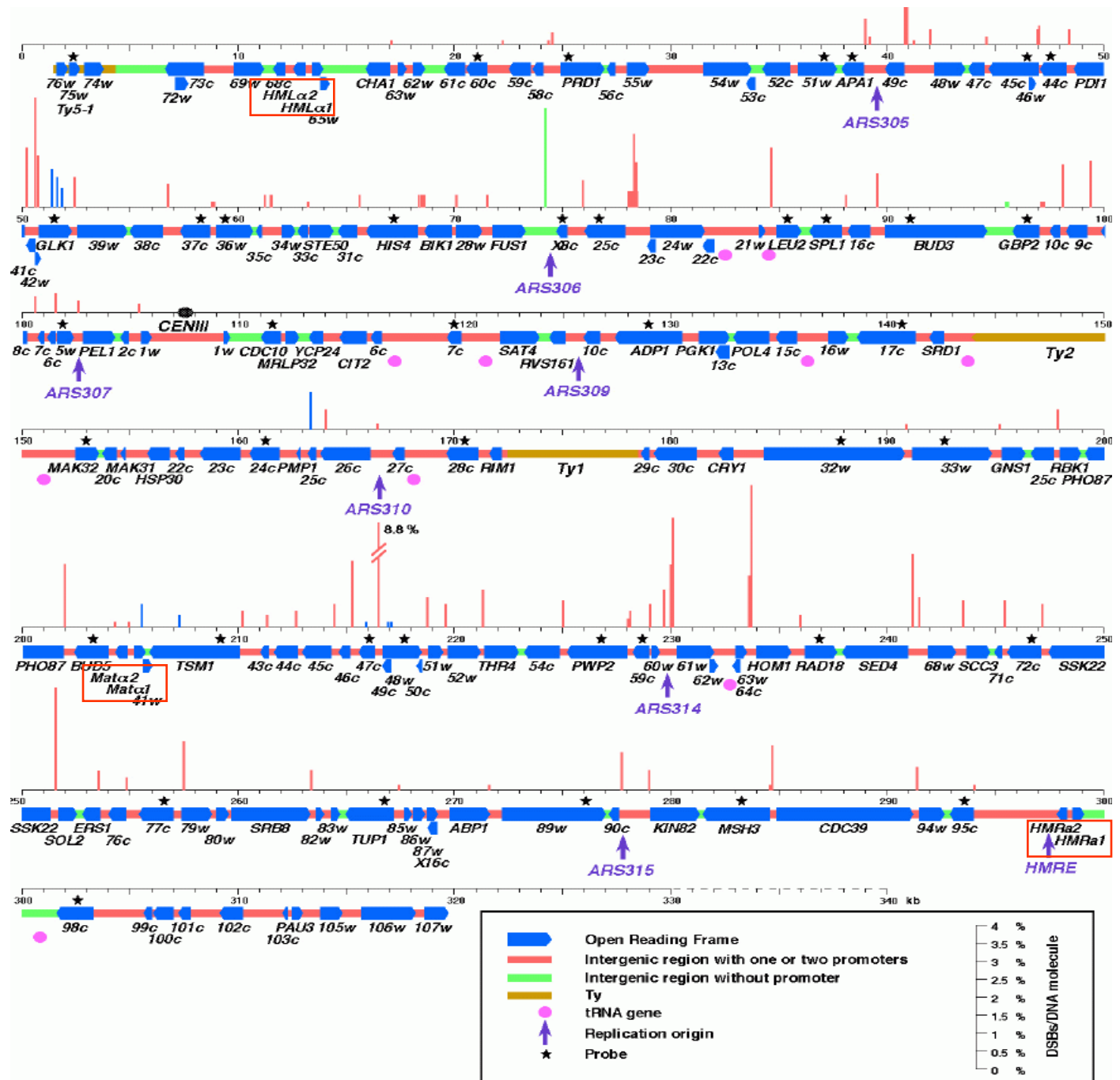
- MAT lokus
- MAT a (HMR) kazeta
- MAT α (HML) kazeta

HML a HMR jsou tiché alely (heterochromatin)

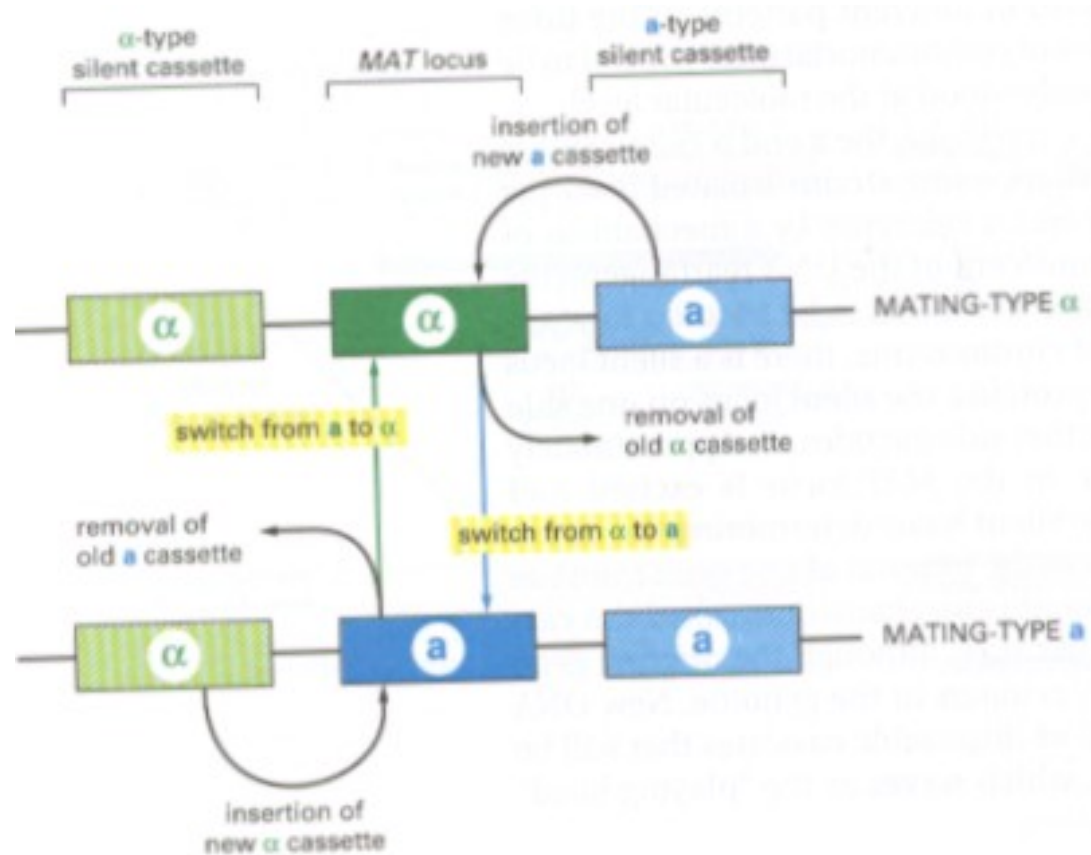
a1, a2 + α 1, α 2 kódují transkripční faktory

HO endonukleasa rozeznává specifické sekvenční

Heterothalické – stabilní
Homothalické – přepínají párovací typ



HO endonukleasa



Molecular Biology of the Cell, kap. 7

HO endonukleasa rozeznává specifické sekvence

Používá se pro vygenerování DSB a studium mechanismů opravy poškozené DNA










Regulace transkripce v haploidních buňkách

a1, a2 + α 1, α 2 kódují transkripční faktory, které ovlivňují transkripci 3 skupin genů

a-spec.= *MFA*1,2 (a-feromon), *STE*2 (α -receptor), *STE*6, 14 (úprava a sekrece feromonu)

α -spec.= *MF* α 1,2 (α -feromon), *STE*3 (a-receptor), *STE*13, *KEX*2 (proteasy)

haploid spec.= *STE*4,18 (podjednotky G-proteinu), *RME*1 (inhibitor meiosis)

MAT lokus	Typ buňky	Geny kontrolované MAT lokusem
a1, a2	a haploid	 aSG ON  α SG OFF  haploid SG ON
α 1, α 2	α haploid	 aSG OFF  α SG ON  haploid SG ON
α 1, α 2 a1, a2	diploid	 aSG OFF  α SG OFF  haploid SG OFF

Přepínání párovacího typu

DNA z MAT lokusu je HO endonukleasou vystřižena a na její místo se překopíruje sekvence z kazety opačného páru

- HO endonukleasa je exprimována pouze v mateřské buňce v G1 fázi (dceřinná si uchová původní typ)

